

Docket No. 0010-1045-0

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Hiroshi IZUI, et al.

GAU:

SERIAL NO: New Application

EXAMINER:

FILED: Herewith

FOR: L-GLUTAMIC ACID PRODUCING BACTERIUM AND PROCESS FOR PRODUCING L-GLUTAMIC ACID

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231



#2/YR
01/03/00

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Japan	10-297350	October 19, 1998

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
(B) Application Serial No.(s)
 - ☐ are submitted herewith
 - ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.

MARVIN J. SPIVAK
REGISTRATION NUMBER 24,913

Norman F. Oblon
Registration No. 24,618

Fourth Floor
1755 Jefferson Davis Highway
Arlington, Virginia 22202
Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 11/98)

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年10月19日

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第297350号

出 願 人

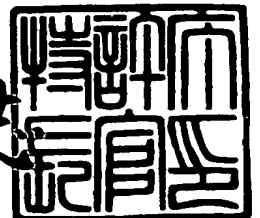
Applicant (s):

味の素株式会社

1999年 6月11日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3037782

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-5935

【提出日】 平成10年10月19日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 13/06

【発明の名称】 L-グルタミン酸生産菌及びL-グルタミン酸の製造法

【請求項の数】 5

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社発酵
技術研究所内

【氏名】 泉井 裕

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社発酵
技術研究所内

【氏名】 守屋 美加

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社発酵
技術研究所内

【氏名】 原 吉彦

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社発酵
技術研究所内

【氏名】 伊藤 久生

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 03 - 3669 - 6571

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 L-グルタミン酸生産菌及びL-グルタミン酸の製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 コリネ型細菌由来のクエン酸シンターゼ遺伝子が導入され、L-グルタミン酸生産能を有する腸内細菌群に属する微生物。

【請求項 2】 コリネ型細菌がブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムである請求項 1 記載の微生物。

【請求項 3】 腸内細菌群に属する微生物がエンテロバクター属またはクレブシエラ属に属する細菌である請求項 1 又は 2 に記載の微生物。

【請求項 4】 前記細菌がエンテロバクター・アグロメランスまたはクレブシエラ・プランティコーラに属する請求項 3 記載の微生物。

【請求項 5】 請求項 1～4 のいずれか一項に記載の微生物を液体培地に培養し、培地中にL-グルタミン酸を生成蓄積せしめ、これを該培地から採取することを特徴とするL-グルタミン酸の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規なL-グルタミン酸生産菌及びそれを用いた発酵法によるL-グルタミン酸の製造法に関する。L-グルタミン酸は、食品、医薬品等として重要なアミノ酸である。

【0002】

【従来技術】

従来、L-グルタミン酸は、主としてブレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属に属するいわゆるコリネ型L-グルタミン酸生産菌またはそれらの変異株を用いた発酵法により製造されている（アミノ酸発酵、学会出版センター、195～215頁、1986年）。その他の菌株を用いた発酵法によるL-グルタミン酸の製造法としては、バチルス属、ストレプトミセス属、ペニシリウム属等の微生物を用いる方法（米国特許第3,220,929号）、シュードモナス属、アースロバクター属、セラチア属、キャンディダ属等の

微生物を用いる方法（米国特許第3, 563, 857号）、バチルス属、シュードモナス属、セラチア属、アエロバクター・アエロゲネス（現エンテロバクター・アエロゲネス）等の微生物を用いる方法（特公昭32-9393号）、エシェリヒア・コリの変異株を用いる方法（特開平5-244970号）等が知られている。

【0003】

上記のような微生物の育種や製造法の改良により、L-グルタミン酸の生産性はかなり高まってはいるが、今後の需要の一層の増大に応えるためには、さらに安価かつ効率的なL-グルタミン酸の製造法の開発が求められている。

【0004】

上記観点から、本発明者は、L-グルタミン酸生産能を有する微生物を広く検索、研究した。その結果、エンテロバクター属、セラチア属、クレブシエラ属又はエルビニア属に属する微生物のL-グルタミン酸の生合成反応を触媒する酵素（クエン酸シンターゼ、フォスフォエノールピルベートカルボキシラーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ）の活性を高めることによって、高いL-グルタミン酸生産能を有する微生物が得られることを見いだしている（特願平10-224909号、特願平10-297129号）。

【0005】

また、エシェリヒア属に属するバリン感受性株に、エシェリヒア属細菌由来のクエン酸シンターゼ（以下、「CS」ともいう）及びフォスフォエノールピルベートカルボキシラーゼをコードする遺伝子を導入し、これらの酵素活性を増幅することによって、高いL-グルタミン酸生産能を有する微生物が得られることを見出している（W0 97/08294号）。

【0006】

一方、コリネバクテリウム属またはブレヴィバクテリウム属細菌において、エシェリヒア・コリ又はコリネバクテリウム・グルタミクム由来のクエン酸シンターゼをコードする遺伝子（CS遺伝子）の導入が、L-グルタミン酸生産能の増強に効果的であったことが報告されている（特公平7-121228号）。これらのコリネ型細菌を宿主とした場合は、宿主と同種のコリネバクテリウム・グルタミクム由

来のCS遺伝子導入が、大腸菌由来のCS遺伝子導入に比べ若干高めの効果を示したが、顕著な差は見られなかった。

【0007】

上記のように、各種微生物にCS遺伝子を導入し、L-グルタミン酸生産能を高めることが知られているが、エシェリヒア属細菌をはじめとする腸内細菌群に属する微生物にコリネ型細菌由来のCS遺伝子を導入した例は知られていない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、L-グルタミン酸生産能を有する新規なL-グルタミン酸生産菌を見出し、安価かつ効率的なL-グルタミン酸の製造法の開発につなげることにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、腸内細菌群のL-グルタミン酸生産能の向上を目指し、遺伝子導入による育種を行った。通常、遺伝子増幅による微生物の育種においては、宿主が目的遺伝子を有している場合は、宿主固有の遺伝子又は宿主に近縁の微生物由来の遺伝子を用いた方が、異種遺伝子を導入するよりも、より良い効果が得られると考えられている。しかし本発明者等は、腸内細菌群においては同種の微生物由来のCS遺伝子に比べて、コリネ型細菌由来のCS遺伝子の導入が、L-グルタミン酸生産能の増強に非常に有効であることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、以下のとおりである。

【0010】

(1) コリネ型細菌由来のクエン酸シンターゼ遺伝子が導入され、L-グルタミン酸生産能を有する腸内細菌群に属する微生物。

【0011】

(2) コリネ型細菌がブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタムである(1)の微生物。

【0012】

(3) 腸内細菌群に属する微生物がエンテロバクター属またはクレブシエラ属に属する細菌である(1)又は(2)の微生物。

【0013】

(4) 前記細菌がエンテロバクター・アグロメランズまたはクレブシエラ・プランティコーラに属する(3)の微生物。

【0014】

(5) 前記(1)～(4)のいずれか一項に記載の微生物を液体培地に培養し、培地中にL-グルタミン酸を生成蓄積せしめ、これを該培地から採取することを特徴とするL-グルタミン酸の製造法。

【0015】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0016】

<1>本発明の微生物

本発明の腸内細菌群に属する微生物は、腸内細菌群に属し、かつ、コリネ型細菌由来のCS遺伝子の導入によってL-グルタミン酸生産能が付与されるか、又はL-グルタミン酸生産能が向上するものであれば特に制限されないが、例えば、エンテロバクター属、クレブシエラ属、セラチア属、エルビニア属、又はエシエリヒア属に属する細菌が挙げられる。これらの中では、エンテロバクター属またはクレブシエラ属に属する細菌が好ましい。以下に、これらの細菌の具体的な例を示すが、本発明の微生物はこれらに限定されない。

【0017】

本発明で使用されるエンテロバクター属に属する微生物には、以下のようなものがある。

エンテロバクター・アグロメランズ (Enterobacter agglomerans)

エンテロバクター・アエロゲネス (Enterobacter aerogenes)

エンテロバクター・アムニゲナス (Enterobacter amnigenus)

エンテロバクター・アスブリア (Enterobacter asburiae)

エンテロバクター・クロエッケ (Enterobacter cloacae)

エンテロバクター・ディソルベンス (*Enterobacter dissolvens*)
エンテロバクター・ジェルゴビア (*Enterobacter gergoviae*)
エンテロバクター・ホルマエッケ (*Enterobacter hormaechei*)
エンテロバクター・インターメディウス (*Enterobacter intermedius*)
エンテロバクター・ニミプレスラリス (*Enterobacter nimipressuralis*)
エンテロバクター・サカザキ (*Enterobacter sakazakii*)
エンテロバクター・テイロレ (*Enterobacter taylorae*)

【0018】

さらに好ましくは、以下に示す菌株が挙げられる。

エンテロバクター・アグロメランス ATCC 12287

エンテロバクター・アグロメランス AJ 13355

エンテロバクター・アグロメランス AJ 13355は、平成10年2月19日に、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に、受託番号FERM P-16644として寄託されている。また、エンテロバクター・アグロメランス ATCC 12287は、ATCCより分譲を受けることができる。

【0019】

エンテロバクター・アグロメランス AJ 13355株は静岡県磐田市の土壌から分離された株である。

AJ 13355の生理的性質を記す。

【0020】

- (1) グラム染色性：陰性
- (2) 酸素に対する挙動：通性嫌気性
- (3) カタラーゼ：ネガティブ
- (4) オキシダーゼ：ポジティブ
- (5) 硝酸還元能：ネガティブ
- (6) フォゲスープロスカウエル試験：ポジティブ
- (7) メチルレッド試験：ネガティブ
- (8) ウレアーゼ：ネガティブ
- (9) インドール生成：ポジティブ

(10) 運動性：有り

(11) T S I 培地での硫化水素生成：微弱な活性あり

(12) β -ガラクトシダーゼ：ポジティブ

【0021】

(13) 糖資化性：

アラビノース：ポジティブ

シュクロース：ポジティブ

ラクトース：ポジティブ

キシロース：ポジティブ

ソルビトール：ポジティブ

イノシトール：ポジティブ

トレハロース：ポジティブ

マルトース：ポジティブ

メリビオース：ポジティブ

アドニトール：ネガティブ

ラフィノース：ポジティブ

サリシン：ネガティブ

メリビオース：ポジティブ

【0022】

(14) グリセロース資化性：ポジティブ

(15) 有機酸資化性：

クエン酸：ポジティブ

酒石酸：ネガティブ

グルコン酸：ポジティブ

酢酸：ポジティブ

マロン酸：ネガティブ

(16) アルギニンデヒドラターゼ：ネガティブ

(17) オルチンデカルボキシラーゼ：ネガティブ

(18) リジンデカルボキシラーゼ：ネガティブ

(19) フェニルアラニンデアミナーゼ：ネガティブ

(20) 色素形成 黄色

(21) ゼラチン液化能：ポジティブ

(22) 生育pH pH4生育不良、pH4.5～7生育良好

(23) 生育温度 25℃生育良好、30℃生育良好、37℃生育良好、42℃生育可、45℃生育不可

【0023】

これらの菌学的性質からAJ13355はエンテロバクター・アグロメランスと判定された。

【0024】

本発明で使用するクレブシエラ属に属する微生物には、以下のようなものがある。

クレブシエラ・プランティコーラ (*Klebsiella planticola*)

クレブシエラ・テリゲナ (*K. terrigena*)

さらに好ましくは、クレブシエラ・プランティコーラ AJ13399が挙げられる。クレブシエラ・プランティコーラ AJ13399は、平成10年2月19日に、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に、受託番号FERMP-16646として寄託されている。

【0025】

クレブシエラ・プランティコーラ AJ13399株は、北海道札幌市の土壌から分離された株である。

以下に、AJ13399の生理的性質を記す。

【0026】

(1) 細胞の形：桿菌

(2) 運動性：なし

(3) 孢子：なし

(4) LabM栄養寒天培地でのコロニー形態：円形、表面は平滑、クリーム色、なめらか、隆起状、光沢有り。

(5) グルコースOFテスト：発酵能ポジティブ

- (6) グラム染色性：陰性
- (7) 酸素に対する挙動：通性嫌気性
- (8) カタラーゼ：ポジティブ
- (9) オキシダーゼ：ネガティブ
- (10) ウレアーゼ：ポジティブ

【0027】

- (11) チトクロームオキシダーゼ：ネガティブ
- (12) β -ガラクトシダーゼ：ポジティブ
- (13) アルギニンデヒドラターゼ：ネガティブ
- (14) オルニチンデカルボキシラーゼ：ネガティブ
- (15) リジンデカルボキシラーゼ：ポジティブ
- (16) トリプトファンデアミナーゼ：ネガティブ
- (17) フォゲスープロスカウエル試験：ポジティブ
- (18) インドール生成：ポジティブ
- (19) T S I 培地での硫化水素生成：ネガティブ
- (20) クエン酸資化性：ポジティブ

【0028】

- (21) M-ハイドロキシベンゼン酸資化性：ネガティブ
- (22) ゼラチン液化能：ネガティブ
- (23) 糖からの酸の生成

- グルコース：ポジティブ
- マンニトール：ポジティブ
- ラムノース：ポジティブ
- アラビノース：ポジティブ
- シュークロース：ポジティブ
- ソルビトール：ポジティブ
- イノシトール：ポジティブ
- メリビオース：ポジティブ
- アミグダリン：ポジティブ

アドニトール-ペプトン-水：ポジティブ

セロビオース-ペプトン-水：ポジティブ

デュルシトール-ペプトン-水：ネガティブ

ラフィノース-ペプトン-水：ポジティブ

(24) 生育温度 37℃生育良好、45℃生育不可

【0029】

これらの菌学的性質から A J 1 3 3 9 9 は、クレブシエラ・ブランティコーラと判定された。

【0030】

本発明で使用するセラチア属に属する微生物には、以下のようなものがある。

セラチア・リクエファシエンス (*Serratia liquefacience*)

セラチア・エントモフィラ (*Serratia entomophila*)

セラチア・フィカリア (*Serratia ficaria*)

セラチア・フォンティコーラ (*Serratia fonticola*)

セラチア・グリメシ (*Serratia grimesii*)

セラチア・プロテアマキュランス (*Serratia proteamaculans*)

セラチア・オドリフェラ (*Serratia odorifera*)

セラチア・プリムシカ (*Serratia plymuthica*)

セラチア・ルビダエ (*Serratia rubidaea*)

【0031】

さらに好ましくは、以下に示す菌株が挙げられる。

セラチア・リクエファシエンス ATCC 14460

セラチア・リクエファシエンス ATCC 14460 は、ATCC より分譲を受けることができる。

【0032】

本発明で使用するエルビニア属に属する微生物には、以下のようなものがある。

エルビニア・ヘルビコーラ (*Erwinia herbicola*)

エルビニア・アナナス (*E. ananas*)
エルビニア・カクティシダ (*E. cacticida*)
エルビニア・クリサンテミ (*E. chrysanthemi*)
エルビニア・マロティボラ (*E. mallotivora*)
エルビニア・ペルシシナス (*E. persicinus*)
エルビニア・プシディ (*E. psidii*)
エルビニア・ケルシナ (*E. quercina*)
エルビニア・ラポンティシ (*E. rhapontici*)
エルビニア・ルブリファシエンス (*E. rubrifaciens*)
エルビニア・サリシス (*E. salicis*)
エルビニア・ウレドボラ (*E. uredovora*)

【0033】

さらに好ましくは、エルビニア・ヘルビコーラ IAM1595が挙げられる。
エルビニア・ヘルビコーラ IAM1595は、東京大学分子細胞生物学研究所より分譲を受けることができる。

【0034】

本発明で使用されるエシェリヒア属に属する微生物には、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) が挙げられる。

【0035】

さらに好ましくは、バリン耐性を有するエシェリヒア・コリ、具体的には以下に示す菌株が挙げられる。

エシェリヒア・コリB11

エシェリヒア・コリK-12 (ATCC10798)

エシェリヒア・コリB (ATCC11303)

エシェリヒア・コリW (ATCC9637)

エシェリヒア・コリK-12 (ATCC10798)、エシェリヒア・コリB (ATCC11303)、エシェリヒア・コリW (ATCC9637) は、ATCCより分譲を受けることができる。

【0036】

尚、上記したようなエンテロバクター属、クレブシエラ属、セラチア属、エルビニア属又はエシェリヒア属に属する細菌等の腸内細菌による糖の代謝はエムデン-マイヤー-ホフ経路を経て行われ、同経路で生成するピルビン酸は好気的条件下ではトリカルボン酸サイクルにて酸化される。L-グルタミン酸は、トリカルボン酸サイクルの中間体である α -ケトグルタル酸より、GDHあるいはグルタミンシンセターゼ/グルタミン酸シンターゼによって生合成される。このように、これらの微生物ではL-グルタミン酸生合成経路は共通のものであり、本発明においては、上記のような微生物は単一の概念を形成する。従って、上記した種または菌株以外の腸内細菌群に属する微生物も本発明に含まれる。

【0037】

本発明の微生物は、上記のような腸内細菌群に属する微生物であって、コリネ型細菌由来のCS遺伝子が導入され、L-グルタミン酸生産能を有する微生物である。ここで「L-グルタミン酸生産能を有する」とは、培養したときに培地中にL-グルタミン酸を蓄積する能力を有することをいう。このL-グルタミン酸生産能は、野生株の性質として有するものであってもよく、育種によって付与または増強された性質であってもよい。また、コリネ型細菌由来のCS遺伝子が導入されることによってL-グルタミン酸生産能が付与される微生物であってもよい。腸内細菌群に属する微生物においてL-グルタミン酸生産能が付与または増強された微生物としては、例えば、L-グルタミン酸の生合成反応を触媒する酵素の活性が高められた微生物、またはL-グルタミン酸の生合成経路から分岐してL-グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下あるいは欠損した微生物が挙げられる。また、L-グルタミン酸の生合成反応を触媒する酵素の活性が高められ、かつ、L-グルタミン酸の生合成経路から分岐してL-グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下あるいは欠損した微生物も含まれる。

【0038】

腸内細菌群に属する微生物に導入するglutA遺伝子の供給源となるコリネ型細菌は、従来ブレヴィバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属に統合された細菌を含み (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1981))、ま

たコリネバクテリウム属と非常に近縁なブレビバクテリウム属細菌を含む。このようなコリネ型細菌の例として以下のものが挙げられる。

【0039】

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム

コリネバクテリウム・アルカノリティカム

コリネバクテリウム・カルナエ

コリネバクテリウム・グルタミカム

コリネバクテリウム・リリウム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

コリネバクテリウム・メラセコーラ

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス

コリネバクテリウム・ハーキュリス

ブレビバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

ブレビバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

ブレビバクテリウム・インマリオフィラム

ブレビバクテリウム・ラクトファーメントム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

ブレビバクテリウム・ロゼウム

ブレビバクテリウム・サッカロリティカム

ブレビバクテリウム・チオゲニタリス

ブレビバクテリウム・アルバム

ブレビバクテリウム・セリヌム

ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム

具体的には、下記のような菌株を例示することができる。

【0040】

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム ATCC 13870

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC 15806

コリネバクテリウム・アルカノリティカム ATCC 21511

コリネバクテリウム・カルナエ ATCC 15991

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13020、13032、13060

コリネバクテリウム・リリウム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC15990

コリネバクテリウム・メラセコーラ ATCC17965

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス AJ12340 (FERM BP-1539)

コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC13868

ブレビバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC14020

ブレビバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC13826、ATCC14067

ブレビバクテリウム・インマリオフィラム ATCC14068

ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC13665、ATCC13869、

ブレビバクテリウム・ロゼウム ATCC13825

ブレビバクテリウム・サッカロリティカム ATCC14066

ブレビバクテリウム・チオゲニタリス ATCC19240

ブレビバクテリウム・アルバム ATCC15111

ブレビバクテリウム・セリヌム ATCC15112

ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム ATCC15354

【0041】

コリネ型細菌由来の *gltA* 遺伝子は、CS活性を欠失した微生物、例えばコリネ型細菌の変異株を用いてその栄養要求性を相補するDNA断片を上記コリネ型細菌の染色体DNAから単離することによって取得できる。コリネ型細菌の *gltA* 遺伝子の塩基配列が明らかにされていることから (Microbiology, 1994, 140, 1817-1828)、その塩基配列に基づいてプライマーを合成し、染色体DNAを鋳型にしてPCR法により取得することが可能である。前記プライマーとしては、配列番号1及び2に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドが挙げられる

【0042】

腸内細菌群に属する微生物にコリネ型細菌由来のCS遺伝子を導入するには、例えば、該CS遺伝子を適当なプラスミド上にクローニングし、得られたプラスミドを用いて宿主となる上記出発親株を形質転換すればよい。形質転換株の細胞内のCS遺伝子（以下、「gltA遺伝子」と略する）のコピー数が上昇し、その結果CS活性が高められる。

【0043】

上記プラスミドとしては、腸内細菌群に属する微生物の細胞中で自律複製可能なプラスミドであれば特に制限されないが、例えばpUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG298、pHSG399、pHSG398、RSF1010、pMW119、pMW118、pMW219、pMW218等が挙げられる。他にもファージDNAのベクターも利用できる。

【0044】

gltA遺伝子の導入は、gltA遺伝子を、宿主となる上記出発親株の染色体DNA上に、好ましくは多コピーで存在させることによっても達成できる。腸内細菌群に属する微生物の染色体DNA上にgltA遺伝子を多コピーで導入するには、レベッティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーティッド・リピート等、染色体DNA上に多コピー存在する配列が利用できる。あるいは、gltA遺伝子をトランスポゾンに搭載して、これを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。形質転換株の細胞内のgltA遺伝子のコピー数が上昇し、その結果CS活性が高められる。

【0045】

形質転換は、例えば、D.M.Morrisonの方法（Methods in Enzymology 68, 326 (1979)）あるいは受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法（Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)）等により行うことができる。

【0046】

導入されるgltA遺伝子は、gltA遺伝子固有のプロモーターに代えて、腸内細菌群に属する微生物の細胞に好適なプロモーター、例えばlac、trp

、 P_L 等のプロモーター等に置換してもよい。

【0047】

遺伝子のクローニング、DNAの切断、連結、形質転換法等の技術については、Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press (1989) に詳述されている。

【0048】

本発明の微生物は、コリネ型細菌由来の *glutA* 遺伝子の導入に加えて、CS以外のL-グルタミン酸生合成を触媒する酵素の活性が高められていてもよい。このようなL-グルタミン酸生合成を触媒する酵素としては、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH)、グルタミンシンターゼ、グルタミン酸シンターゼ、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、アコニット酸ヒドラターゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC)、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、エノラーゼ、ホスホグリセロムターゼ、ホスホグリセリン酸キナーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、フルトースビスリン酸アルドラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコースリン酸イソメラーゼ等がある。

さらに、L-グルタミン酸の生合成経路から分岐してL-グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下または欠損していてもよい。L-グルタミン酸の生合成経路から分岐してL-グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素としては、 α ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ (α KG DH)、イソクエン酸リアーゼ、リン酸アセチルトランスフェラーゼ、酢酸キナーゼ、アセトヒドロキシ酸シンターゼ、アセト乳酸シンターゼ、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、1-ピロリンデヒドロゲナーゼ、等がある。これらの酵素の中では、 α KG DHが好ましい。

【0049】

PEPCをコードする遺伝子、およびGDHをコードする遺伝子は、おのこのPEPCまたはGDH活性を欠失した変異株を用いて、その栄養要求性を相補するDNA断片を上記微生物の染色体DNAから単離することによって取得できる

。またエシェリヒア属細菌のこれら遺伝子、コリネバクテリウム属細菌のこれら遺伝子は既に塩基配列が明らかにされていることから (Biochemistry、第22巻、5243~5249頁、1983年; J. Biochem.、第95巻、909~916頁、1984年; Gene、第27巻、193~199頁、1984年; Mol. Gen. Genet.、第218巻、330~339頁、1989年; Molecular Microbiology、第6巻、317~326頁、1992年)、それぞれの塩基配列に基づいてプライマーを合成し、染色体DNAを鋳型にしてPCR法により取得することが可能である。

【0050】

腸内細菌群に属する微生物において、上記のような酵素の活性を低下または欠損させるには、通常の変異処理法によって、あるいは遺伝子工学的手法によって、上記酵素の遺伝子に、細胞中の当該酵素の活性が低下または欠損するような変異を導入すればよい。

【0051】

変異処理法としては、たとえばX線や紫外線を照射する方法、またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン等の変異剤で処理する方法等がある。遺伝子に変異が導入される部位は、酵素タンパク質をコードするコード領域であってもよく、プロモーター等の発現制御領域であってもよい。

【0052】

また、遺伝子工学的手法には、例えば遺伝子組換え法、形質導入法、細胞融合法等を用いる方法がある。例えば、クローン化された目的遺伝子の内部に薬剤耐性遺伝子を挿入し、機能を失った遺伝子(欠失型遺伝子)を作製する。次いで、この欠失型遺伝子をエンテロバクター属またはセラチア属に属する微生物の細胞に導入し、相同組み換えを利用して染色体上の目的遺伝子を前記欠失型遺伝子に置換する(遺伝子破壊)。

【0053】

細胞中の目的酵素の活性が低下または欠損していること、および活性の低下の程度は、候補株の菌体抽出液または精製画分の酵素活性を測定し、野生株と比較することによって確認することができる。例えば、 α KGDH活性は、Reedらの

方法 (L.J.Reed and B.B.Mukherjee, Methods in Enzymology 1969, 13, p.55-61) に従って酵素活性を測定することができる。

【0054】

また、目的とする酵素によっては、変異株の表現型によって目的変異株を選択することができる。例えば、 α KGDH活性が欠損もしくは低下した変異株は、好氣的培養条件ではグルコースを含む最少培地、あるいは、酢酸やL-グルタミン酸を唯一の炭素源として含む最少培地で生育できないか、または生育速度が著しく低下する。ところが、同一条件でもグルコースを含む最少培地にコハク酸またはリジン、メチオニン、及びジアミノピメリン酸を添加することによって通常の生育が可能となる。これらの現象を指標として α KGDH活性が欠損もしくは低下した変異株の選抜が可能である。

【0055】

相同組換えを利用したブレビバクテリウム・ラクトファーマンタムの α KGDH遺伝子欠損株の作製法は、WO95/34672号に詳述されており、エンテロバクター属およびセラチア属に属する微生物にも同様の方法を適用することができる。

【0056】

以上のようにして得られる α KGDH活性が欠損もしくは低下した変異株の具体例としては、エンテロバクター・アグロメランス AJ13356、及びクレブシエラ・プランティコーラ AJ13410が挙げられる。エンテロバクター・アグロメランス AJ13356は、平成10年2月19日に、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に、受託番号FERM P-16645として寄託されている。また、クレブシエラ・プランティコーラ AJ13410は、平成10年2月19日に、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に、受託番号FERM P-16647として寄託されている。

腸内細菌群に属し、コリネ型細菌由来のglutA遺伝子を導入された微生物を液体培地に培養することにより、培地中にL-グルタミン酸を生成蓄積させることができる。

【0057】

前記培地としては、炭素源、窒素源、無機塩類、その他必要に応じてアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常の栄養培地を用いることができる。合成培地または天然培地のいずれも使用可能である。培地に使用される炭素源および窒素源は、培養する菌株の利用可能なものならばよい。

【0058】

炭素源としてはグルコース、グリセロール、フラクトース、シュクロース、マルトース、マンノース、ガラクトース、でんぷん加水分解物、糖蜜等の糖類が使用され、その他、酢酸、クエン酸等の有機酸等も単独あるいは他の炭素源と併用して用いられる。

【0059】

窒素源としてはアンモニア、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等のアンモニウム塩または硝酸塩等が使用される。

【0060】

有機微量栄養素としては、アミノ酸、ビタミン、脂肪酸、核酸、さらにこれらのものを含有するペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、大豆蛋白分解物等が使用され、生育にアミノ酸等を要求する栄養要求性変異株を使用する場合には要求される栄養素を補添する事が必要である。

【0061】

無機塩類としてはリン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩、マンガン塩等が使用される。

培養方法は、発酵温度20ないし42℃、pHを4ないし8に制御しつつ通気培養を行う。かくして10時間ないし4日間程度培養することにより培養液中に著量のL-グルタミン酸が蓄積される。

【0062】

培養終了後、培養液中に蓄積されたL-グルタミン酸を単離する方法としては公知の方法に従って行えばよい。例えば、培養液から菌体を除去した後に濃縮晶析する方法、あるいはイオン交換クロマトグラフィー等によって単離することが

できる。

【0063】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

【0064】

<1>ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム由来の g l t A 遺伝子を有するプラスミドの作製

ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム由来の g l t A 遺伝子を有するプラスミドは、以下のようにして構築した。コリネバクテリウム・グルタミカムの g l t A 遺伝子の塩基配列 (Microbiology, 1994, 140, 1817-1828) をもとに、配列番号 1 及び 2 に示す塩基配列を有するプライマー DNA を用い、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 13869 の染色体 DNA を鋳型として PCR を行い、約 3 k b の g l t A 遺伝子断片を得た。この断片を S m a I 消化したプラスミド p H S G 3 9 9 (宝酒造 (株) より購入) に挿入し、プラスミド p H S G C B を得た (図 1)。次に、p H S G C B を H i n d I I I で切断し切り出された約 3 k b の g l t A 遺伝子断片を H i n d I I I 消化したプラスミド p M W 2 1 8 (ニッポンジーン (株) より購入) に挿入し、プラスミド p M W C B を得た (図 1)。得られたプラスミド p M W C B が g l t A 遺伝子を発現していることは、エンテロバクター・アグロメランス A J 1 3 3 5 5 株中での酵素活性の測定によって確認した。

【0065】

<2>エシェリヒア・コリ由来の g l t A 遺伝子を有するプラスミドの作製

対象として、エシェリヒア・コリ由来の g l t A 遺伝子を有するプラスミドを、以下のようにして構築した。g l t A 遺伝子を有するプラスミド p T W V C (W O 9 7 / 0 8 2 9 4 号) を H i n d I I I、E c o R I 消化して得られた g l t A 遺伝子を有する DNA 断片を精製回収後、プラスミド p M W 2 1 9 (ニッポンジーン (株) より購入) の H i n d I I I、E c o R I サイトに導入することによって、プラスミド p M W C を得た (図 2)。得られたプラスミド p M W C が g l t A 遺伝子を発現していることは、エシェリヒア・コリの g l t A 遺伝子欠

損株の栄養要求性の相補と酵素活性の測定によって確認した。

【0066】

<3>エンテロバクター・アグロメランスとクレブシエラ・プランティコーラへの *gluA* 遺伝子の導入、及び L-グルタミン酸の製造

エンテロバクター・アグロメランス AJ13355 株及びクレブシエラ・プランティコーラ AJ13399 株を、pMWC あるいは pMWCB を用いて形質転換した。得られた形質転換株、AJ13355/pMWC、AJ13355/pMWCB、AJ13399/pMWC、AJ13399/pMWCB を、それぞれグルコース 40 g/L、硫酸アンモニウム 20 g/L、硫酸マグネシウム 7 水塩 0.5 g/L、リン酸 2 水素カリウム 2 g/L、塩化ナトリウム 0.5 g/L、塩化カルシウム 7 水塩 0.25 g/L、硫酸第一鉄 7 水塩 0.02 g/L、硫酸マンガン 4 水塩 0.02 g/L、硫酸亜鉛 2 水塩 0.72 mg/L、硫酸銅 5 水塩 0.64 mg/L、塩化コバルト 6 水塩 0.72 mg/L、ホウ酸 0.4 mg/L、モリブデン酸ナトリウム 2 水塩 1.2 mg/L、酵母エキス 2 g/L、炭酸カルシウム 30 g/L を含有する培地 20 ml を注入した 500 ml 容フラスコに接種して、37℃で15時間振とう培養した。培養終了後、培養液中に蓄積した L-グルタミン酸及び残存したグルコースを測定した結果を表 1 に示した。

【0067】

【表 1】

菌株	L-グルタミン酸蓄積量 (g/L)	グルコース残存量 (g/L)
AJ13355	0	0
AJ13355/pMWC	0.01	6.0
AJ13355/pMWCB	0.78	28.5
AJ13399	0	0
AJ13399/pMWC	2.85	0
AJ13399/pMWCB	4.71	0

【0068】

エンテロバクター・アグロメランス AJ13355 株及びクレブシエラ・プラ
ンティコーラ AJ13399 株ともに、gltA 遺伝子の導入により L-グルタ
ミン酸生産能が認められた。L-グルタミン酸の蓄積は、エシェリヒア・コリ由
来の gltA 遺伝子よりも、ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム由来の
gltA 遺伝子を導入した方が顕著であった。尚、AJ13355/pMWCB は、上記条件
ではかなりの量のグルコースが消費されずに残っていたが、グルコースを全て消
費するまで培養を行えば、1.5~2 g/L 程度の L-グルタミン酸を蓄積する
ことが予想される。

【0069】

尚、AJ13355/pMWC と AJ13355/pMWCB、及び AJ13399/pMWC と AJ13399/pMWCB は、そ
れぞれ保持するプラスミドのコピー数に顕著な差は認められなかった。

【0070】

【発明の効果】

本発明により、腸内細菌群に属する微生物に効率よく L-グルタミン酸生産能
を付与することが可能となることから、コリネ型 L-グルタミン酸生産菌で従来
知られている育種手法等を用いてさらに高い生産能を付与できると考えられる。
また培養条件等の検討により、安価で、効率の良い L-グルタミン酸製造法の開
発につながるものと期待される。

【0071】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

【0072】

<110> 味の素株式会社 (Ajinomoto Co., Inc.)

<120> L-グルタミン酸生産菌及び L-グルタミン酸の製造法

<130> P-5935

<141> 1998-10-19

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

【0073】

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 1

gtcgacaata gccygaatct gttctggtcg

30

【0074】

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 2

aagcttatcg acgctcccct ccccaccgtt

30

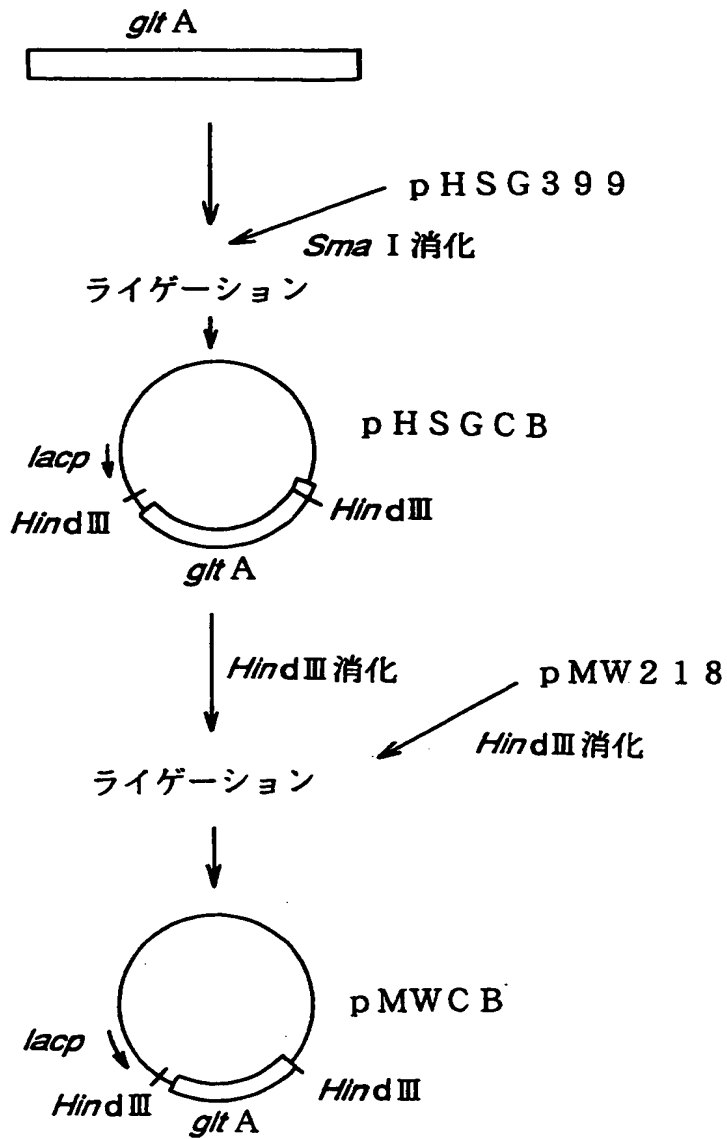
【図面の簡単な説明】

【図1】 g l t A遺伝子を有するプラスミド pMWCB の構築を示す図。

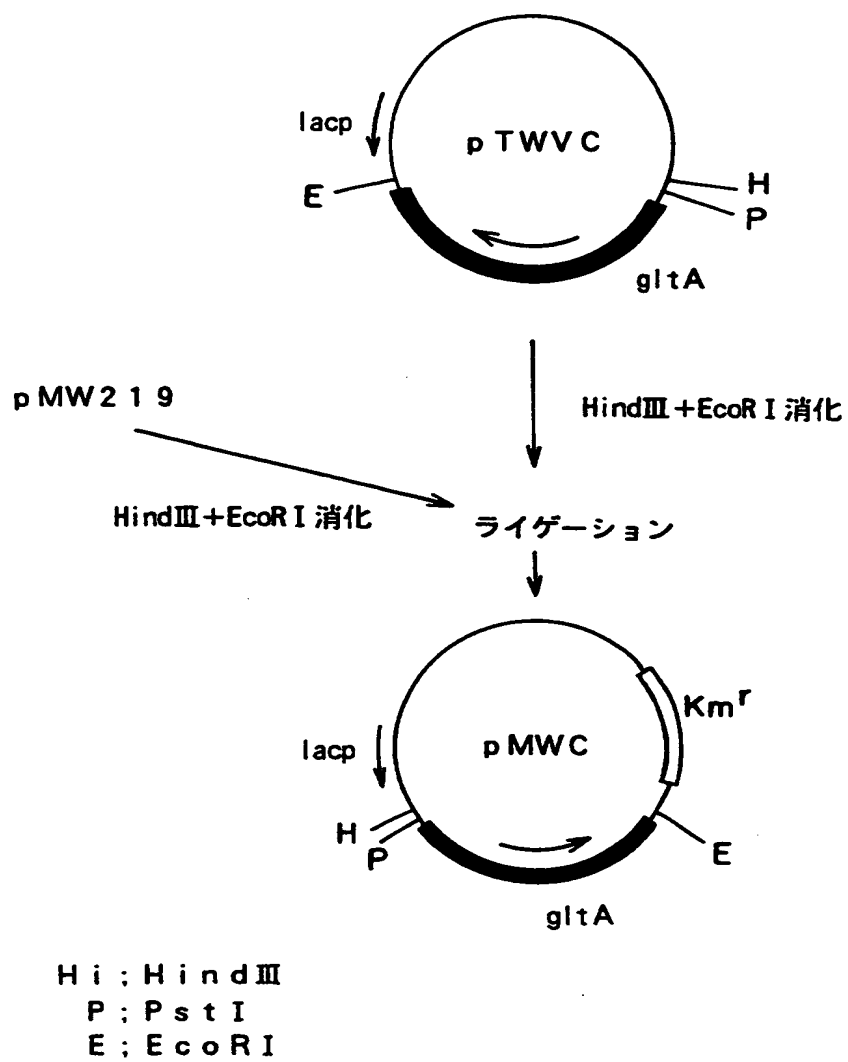
【図2】 g l t A遺伝子を有するプラスミド pMWC の構築を示す図。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 L-グルタミン酸生産能を有する新規なL-グルタミン酸生産菌を取得し、安価かつ効率的なL-グルタミン酸の製造法の開発につなげる。

【解決手段】 コリネ型細菌由来のクエン酸シンターゼ遺伝子を、エンテロバクター属、クレブシエラ属、セラチア属、エルビニア属、又はエシェリヒア属に属する腸内細菌に導入し、得られた微生物を液体培地に培養し、培地中にL-グルタミン酸を生成蓄積せしめ、これを該培地から採取することにより、L-グルタミン酸を製造する。

【選択図】 図1

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【住所又は居所】 東京都中央区京橋 1 丁目 15 番 1 号

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100089244

【住所又は居所】 東京都中央区東日本橋 3 丁目 4 番 10 号 ヨコヤマ
ビル 6 階 秀和特許法律事務所

【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【住所又は居所】 東京都中央区東日本橋 3 丁目 4 番 10 号 ヨコヤマ
ビル 6 階 秀和特許法律事務所

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【住所又は居所】 東京都中央区東日本橋 3 丁目 4 番 10 号 ヨコヤマ
ビル 6 階 秀和特許法律事務所

【氏名又は名称】 川口 嘉之

特平 10-297350

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000066]

1. 変更年月日	1991年 7月 2日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都中央区京橋1丁目15番1号
氏 名	味の素株式会社